

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА II ТИПА ПРИ ДИСПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ

*Лесничая О.В. *, Крылов Ю.В. ***

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет» **

*Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро ***

Рак шейки матки является одной из наиболее распространённых форм новообразований [1].

В настоящее время признано, что ключевым фактором в его этиопатогенезе является вирусное поражение. При этом главенствующую

позицию занимает вирус папилломы человека (ВПЧ), обладающий высоким онкогенным потенциалом и являющийся основным экзогенным фактором цервикального канцерогенеза.

Однако роль вируса простого герпеса также заслуживает внимания. Нет сомнения в том, что клетки, инфицированные вирусом простого герпеса (ВПГ) и вирусом папилломы человека (ВПЧ) могут продолжать существовать и затем прогрессировать в цервикальную карциному, потому что ДНК обоих вирусов были выделены при исследовании биопсий с цервикальным раком [2]. Наиболее логичный вариант участия ВПГ как кофактора в прогрессии диспластических изменений в цервикальную карциному это индукция повреждения клеточной ДНК и хромосомных нарушений в клетках цервикального эпителия, которые позже инфицируются ВПЧ [2].

Одним из основных методов предупреждения развития рака является ранняя, достоверная и доступная диагностика и лечение вирусного поражения шейки матки.

Таким образом, целью настоящего исследования явился анализ наиболее часто используемых методов исследования: МФА (метод флюоресцирующих антител), ПЦР (полимеразно-цепная реакция) и иммуногистохимия.

Метод флюоресцирующих антител, МФА.

Данный метод основывается на реакции антигена с антителами, конъюгированными с флюоресцирующими красителями (флюорохромами); последние дают характерное свечение при облучении коротковолновым светом.

Существуют две модификации МФА: при так называемом прямом методе используются флюоресцирующие антитела, специфические в отношении искомого антигена; непрямой МФА предполагает на первом этапе взаимодействие антигена с немеченой иммунной сывороткой, а на втором — присоединение к связавшимся антителам конъюгата, содержащего антивидовые антитела, специфические в отношении глобулинов животного, использованного для приготовления иммунной сыворотки к искомому антигену. При непрямом МФА один и тот же конъюгат можно использовать при поиске разных антигенов.

К достоинствам МФА относят возможность его использования для определения морфологической локализации антигена, а также доступность, однако стоимость набора (одной ампулы для проведения 30 исследований) составляет 6300 тыс. белорусских рублей.

Недостатком считается трудность установления каких-либо количественных параметров теста, невысокая чувствительность и специфичность. Также, при использовании МФА возможно получение ложноположительных (за счёт неспецифической адсорбции конъюгата с клетками) результатов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR). В настоящее время ПЦР-диагностика является, пожалуй, самым точным и чувствительным методом диагностики инфекционных заболеваний.

В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определенного участка ДНК. В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции.

ПЦР – метод молекулярной диагностики, ставший для ряда инфекций "золотым стандартом", проверен временем и тщательно апробирован клинически. Метод ПЦР позволяет определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул его ДНК. ПЦР позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей. Чувствительность метода значительно превосходит таковую у иммунохимических и микробиологических методов, а принцип метода позволяет диагностировать наличие инфекций со значительной антигенной изменчивостью.

Специфичность ПЦР при использовании технологии PCR даже для всех вирусных, хламидийных, микоплазменных, уреоплазменных и большинства других бактериальных инфекций достигает 100%. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно.

Данный метод по стоимости также не является дорогим: стандартный набор с постановкой контроля, транспортной средой и другими необходимыми материалами стоит 380 тыс. белорусских рублей на 110 исследований.

Для успешного проведения анализа важно правильно собрать материал у пациента и правильно провести пробоподготовку. Известно, что в лабораторной диагностике большинство ошибок (до 70%) совершается именно на этапе пробоподготовки.

Техника забора материала, условия его хранения, доставки, приготовления для исследования весьма сложна и трудоёмка. Поэтому для скринингового метода исследования женщин она не подходит. Кроме того, для вируса простого герпеса есть одно правило: заражения без серологического ответа (т.е. выработки антител) не бывает, так как для него слизистая половых путей – только входные ворота в организм. Метод ПЦР хорош только в первые 2-3 недели после заражения: антитела ещё не выработались, их в крови нет, а в слизистой можно выделить вирусный геном.

Иммуногистохимия – метод морфологической диагностики, в основе которого лежит визуализация и оценка с помощью микроскопа результатов реакции антиген-антитело в срезах биопсированной ткани. В качестве антигена выступают компоненты клеточных структур или межклеточного вещества ткани. Антитела получают из сыворотки крови животных, иммунизированных интересующим антигеном, или от культуры ткани гибридомы.

Иммуногистохимические препараты могут длительно храниться, результаты иммуногистохимической реакции точно привязаны к структуре тканей.

Принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики, использующих реакцию антиген-антитело,

является структурная специфичность исследования. Это означает, что в реакции оценивается не только наличие сигнала (есть окрашивание или нет) и его сила (интенсивность окрашивания), но и пространственное распределение сигнала в гистологическом препарате (окрашивание мембран клеток, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов).

В морфологической (биопсийной) диагностике герпетического поражения шейки матки иммуногистохимические методы позволяют решать следующие главные задачи: 1) поиск инфекционных агентов (вирусы герпеса I или II типа); 2) определение характера патологического процесса в плохо сохранившихся биоптатах или биоптатах с недостаточным объемом материала.

Метод является высокоспецифичным и чувствительным, что оправдывает его стоимость (стоимость набора для 96 исследований составляет до 1800 тыс. белорусских рублей).

Выводы.

Таким образом, для получения точного, информативного результата наиболее подходящим является иммуногистохимический метод, практически лишенный недостатков, за исключением высокой стоимости. Метод ПЦР-исследования, хоть и является относительно недорогим и высокоспецифичным, но сопрягается с рядом трудностей в заборе, хранении и приготовлении материала, что не может быть использовано для скринингового обследования женщин с дисплазией. Самый дорогим методом исследования является МФА, однако специфичность и чувствительность его далеко уступает двум предыдущим.

Литература:

- 1 Новик, ВИ Эпидемиология рака шейки матки, факторы риска, скрининг: практ онкол. / ВИ Новик – 2002 – Vol. 3 (3) С. 156-165
- 2 Clinton Jones., Center for Biotechnology, Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, 1995 Cervical Cancer: Is Herpes Simplex Virus Type II a Cofactor? 68583 Clinical Microbiology Reviews, Oct. 1995, p. 549-556.